Lane Medical Library

Aus der Chemischen Abteilung (Prof. Dr. A. Hahn) des
Physiologischen Institutes München.
(Direktor: Prof. Dr. Ph. Broemser).

Zum Mechanismus des Erholungsvorganges im Muskel

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dr.- phil. Erich Fischbach

aus Konstanz a. B.

1937

Druckerei u. Verlag wissenschaftlicher Werke Konrad Triltsch, Würzburg

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Referent:
Prof. Dr. med. et phil. A. Hahn.

Problemstellung.

Von A. Hahn u. Mit. ist nachgewiesen worden, daß die chemischen Vorgänge im Muskelbrei und die bei der Erholung des intakten Muskels nicht gleichgesetzt werden können (7. 9.). Es zeigte sich, daß die Kohlehydratbildung, die ein Teilvorgang der Erholung des Muskels in Sauerstoff darstellt, von der Struktur des Muskels abhängt und schon einmaliges Querzerschneiden genügt, um die Bildung von Kohlehydrat erheblich herabzusetzen; bei Verwendung von Muskelbrei konnte eine Kohlehydratbildung überhaupt nicht mehr nachgewiesen werden. Besonders interessant ist der Befund, daß bei längsgeschnittenen Muskeln die Kohlehydratbildung nicht gestört ist, da dabei wenig Fibrillen verletzt werden. Es ist nach diesen Ergebnissen ein Zurückführen des Erholungsvorganges auf einfache physikalisch-chemische Vorgänge nicht möglich, wie es teilweise versucht worden ist.

Auf diese Tatsache, daß die Kohlehydratbildung an die Muskelstruktur geknüpft ist und nur bei Gegenwart von Sauerstoff sich abspielt, wird in der folgenden Untersuchung in Verbindung mit den nachfolgenden Erörterungen näher eingegangen.

Es sind nämlich die biologischen Oxydationen nach der Wielandschen Theorie (18.) in ihrem Wesen Dehydrierungen, bei denen Wasserstoff aktiviert und mit dem physiologischen Akzeptor Sauerstoff in Verbindung gebracht wird. Als Hauptbeweis für diese Theorie gelten die Versuche bei denen der Sauerstoff durch andere Wasserstoffakzeptoren ersetzt wurde; für diese sog. sauerstofflosen Oxydationen ist das Methylenblau viel benützt worden, da die Reaktion durch eine Farbveränderung verfolgt werden kann.

Es fehlte aber lange der experimentelle Nachweis eines durch die Methylenblauoxydation entstehenden Stoffes. Zum erstenmal beobachteten Quastel und Whetham (17.) die Bildung von Fumarsäure aus Bernsteinsäure im Vakuum bei Gegenwart von Methylenblau durch Bakterien. Fischer (3.), sowie A. Hahn und Mit. (10.) haben 1928 mit verschiedenen Methoden den Nachweis erbracht, daß bei Gegenwart von Muskelbrei beim Abbau der Bern-

steinsäure Fumarsäure entsteht. Über den weiteren Abbau erbrachten sie den Beweis, daß diese durch Wasseranlagerung in Äpfelsäue übergeht und bei weiterer Dehydrierung Oxalessigsäure ergibt. Diese spaltet sehr leicht CO_2 ab und geht in Brenztraubensäure über.

In weiteren Arbeiten, besonders von A. Hahn und Mit. (2. 6.), sind eine Reihe von anderen organischen Substanzen festgestellt worden, die durch Dehydrierung unter Abwesenheit von Sauerstoff bei Gegenwart von Methylenblau abgebaut werden.

Nachdem es somit in zahlreichen Versuchen gelungen ist, den physiologischen Akzeptor Sauerstoff durch Methylenblau zu ersetzen, lag der Gedanke nahe zu untersuchen, ob bei dem Erholungsvorgang im Muskel der Sauerstoff durch einen künstlichen Wasserstoffakzeptor z. B. Methylenblau ersetzt werden kann.

Zur Prüfung dieser Frage wird von der eingangs erwähnten Tatsache ausgegangen, daß die Bildung von Kohlehydrat in lakatathaltiger Ringerlösung von der Muskelstruktur abhängig ist und nur bei Gegenwart von Sauerstoff sich vollzieht (7. 9.).

Versuche, die in dieser Richtung bei anderen komplizierteren biologischen Vorgängen durchgeführt wurden (18. 19.) sind bis jetzt fehlgeschlagen. Bisher konnte z. B. bei der Herztätigkeit, bei der Reflexerregbarkeit und Atmung des Nerven der Sauerstoff nicht durch andere Wasserstoffakzeptoren ersetzt werden.

Methodik.

Es wurden zu einem Versuchspaar 5—20 Frösche benützt, deren Sartorien möglichst ohne Verletzung herauspräpariert worden waren. Die Zahl der Sartorien richtete sich nach dem Glykogengehalt der Muskeln, die von Winter- und Frühjahrsfröschen stammten. Bei den Versuchen im Frühjahr brauchte man mehr Sartorien, da diese einen geringeren Kohlehydratgehalt aufweisen als die von Winterfröschen. Die Muskeln der einen Seite kamen in 10 ccm isotonische Ringerlösung ohne Laktazusatz, die der anderen in eine laktathaltige Ringerlösung; die Muskeln mit der Lösung kamen in große Reagenzgläser, die evakuiert und während des Versuches unter Wasser von 25° C geschüttelt wurden, damit die Sartorien mit der methylenblauhaltigen Flüssigkeit in enger Berührung blieben. Die Versuchsdauer betrug 2—3 Stunden.

Der eigentliche Versuch hatte folgende Zusammensetzung:

5—20 Froschsartorien,
5 ccm doppelt isotonische Ringerlösung mit bzw. ohne Laktat,
4,5 ccm Wasser,
0,5 ccm 1,25 % Methylenblaulösung.

Die doppelt isotonische Ringerlösung wurde hergestellt durch Auflösen von 0,9 g NaCl, 0,015 KCl, 0,03 CaCl in 70 ccm Wasser, die mit 5 ccm Phosphatlösung versetzt wurden.

Nach Abschluß der Versuche wurden in der ersten Versuchsreihe die Gesamtkohlehydrate nach Lesser und in der zweiten Versuchsreihe der Glykogengehalt der Muskeln nach A. Hahn und Mit. bestimmt.

Der Glykogengehalt wurde deshalb noch bestimmt, damit bewiesen werden konnte, daß es sich tatsächlich um die Bildung höherer Kohlehydrate handelt und nicht um das Vorhandensein von reduzierend wirkenden Stoffen, die bei der Methylenblauoxydation entstehen könnten.

Bestimmung der Gesamtkohlehydrate nach Lesser.

Nach der Methode von Lesser (14.) kommen die Muskeln in kleine Fläschchen und werden mit 2,2 % HCl versetzt; das Ganze wird in ein siedendes Wasserbad gestellt. Die Sartorien zerfallen nach kurzem Schütteln und dann wird noch weiter 3 Stunden erhitzt. Man führt danach den ganzen Inhalt des Fläschchens in ein 200 ccm Meßkölbchen über und neutralisiert mit 30 % Natronlauge. Es werden 5 g Merkuriacetat, die in 25 ccm Wasser gelöst sind, hinzugefügt und bis zur Marke aufgefüllt. Der Inhalt wird in ein Erlenmeyer-Kölbchen übergeführt, geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Am folgenden Tag wird abfiltriert und das Quecksilber durch Einleiten von Schwefelwasserstoff ausgefällt. 75 ccm von dem Filtrat werden im Vaakum bei 60° fast zur Trockene eingedampft; der Rückstand wird in 25 ccm Wasser gelöst und damit die Zuckerbestimmung nach Bertrand (1.) durchgeführt.

Glykogenbestimmung.

Methode von A. Hahn und Schäfer (4.).

Zur Bestimmung des Glykogens bringt man nach Pflüger (12. 15. 16.) die Muskeln mit der Lösung und etwas Waschwasser in einen Erlenmeyer-Kolben von 200 ccm Inhalt und fügt soviel conc. Lauge hinzu, bis diese eine Konzentration von 37 % hat. Am besten erreicht man dies durch Hinzufügen von Ätzkali in Plätzchenform (Merck); der Muskel wird dabei als Wasser gerechnet. Das Kölbchen wird mit einem Gummistopfen, durch den ein Glasrohr mit einer feinen Öffnung führt, verschlossen. Das Ganze kommt dann in ein siedendes Wasserbad, wo es 2 Stunden erhitzt wird. Danach wird abgekühlt und durch Glaswolle filtriert und mit etwas Wasser nachgewaschen. Zum Filtrat gibt man das doppelte Volumen 96 % Alkohol, wonach das Glykogen ausfällt. Nach Stehen über Nacht setzt sich das Glykogen am Boden ab und wird nun nicht nach Pflüger filtriert, sondern die über dem Glykogenniederschlag befindliche Flüssigkeit mit einem Glasrohr, das mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung ist, abgesaugt. Der Glykogenrückstand wird in etwa 40 ccm Wasser gelöst, in eine Kristallisierschale übergeführt und das Glykogen nochmals durch Zusatz von 96 % Alkohol ausgefällt. Bis zum andern Tag hat sich der Niederschlag abgesetzt und die überstehende Flüssigkeit wird wieder abgesaugt. Zur Aufspaltung des Glykogens zu Glukose löst man den Niederschlag in 25 ccm Wasser und spült alles in einen 100 ccm Kolben über; dazu kommen 35 ccm 4,4 % Salzsäure. Der Kolben wird mit einem Gummistopfen, durch den ein enges Glasrohr führt, verschlossen und 2 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wird vorsichtig mit Natronlauge neutralisiert und dann im Vaakum bei 60° auf etwa 50 ccm eingedampft. Damit führt man die Glukosebestimmung nach Bertrand durch (1.).

Versuche über die Bildung von Kohlehydraten bei Abwesenheit von Sauerstoff und Gegenwart von Methylenblau.

I. Versuche mit Bestimmung der Gesamtkohlehydrate.

Die Sartorien der einen Seite kamen in eine Ringerlösung ohne, die der anderen Seite in eine mit Laktat. Nach Einbringen der

Muskeln wurden die Gefäße zur Entfernung des Sauerstoffs evakuiert; diese kamen dann in Wasser von 25°. Die Versuchsdauer betrug 2 Stunden. Nach Beendigung der Versuche wurden die Gesamtkohlehydrate nach Lesser bestimmt.

Die Versuche ergaben, daß beim intakten Muskel in der laktathaltigen Lösung bei Gegenwart von Methylenblau in den 8 Fällen 7mal eine Vermehrung der Kohlehydrate eingetreten ist. Bei früheren Versuchen von Hahn und Mit. (9.), bei denen die intakten Muskeln bei Gegenwart von Sauerstoff geschüttelt wurden, ist der Mittelwert der Kohlehydratvermehrung größer; er beträgt + 2,2 mg und bei den Methylenblauversuchen + 1,1 mg Kohlehydrat.

Bei Verwendung von Sartorien, die möglichst in der Mitte längsgeschnitten wurden, zeigte sich, daß die Kohlehydratbildung in laktathaltiger Lösung bei Gegenwart von Methylenblau durch Längszerschneidung der Muskeln nicht verändert worden ist. Der Mittelwert der Kohlehydratbildung beträgt + 2,24 mg und bei den früheren Versuchen mit Sauerstoff + 2,78 mg Kohlehydrat.

Man erkennt hieraus, daß bei längsgeschnittenen Muskeln bei Gegenwart von Methylenblau die Bildung von Kohlehydraten fast ebenso groß ist wie bei Sauerstoffversuchen. Die Längszerschneidung übt bei den Methylenblauversuchen einen fördernden Einfluß aus, vielleicht weil der Farbstoff in innigere Berührung mit den Muskelfasern kommt.

Aus der Versuchsreihe mit Methylenblau und mit querzerschnittenen Muskeln ist zu entnehmen, daß schon durch einmaliges Querzerschneiden des Muskels Bedingungen geschaffen werden, die die Bildung von Kohlehydraten in laktathaltiger Lösung praktisch aufheben. In früheren Versuchen mit Sauerstoff hat sich das gleiche gezeigt.

Der Mittelwert der Kohlehydratvermehrung bei den Methylenblauversuchen betrug — 0,06, bei den Versuchen mit Sauerstoff + 0,51 mg Kohlehydrate.

Nachdem schon einmaliges Querzerschneiden von intaktem Muskel die Bildung der Kohlehydrate aufhebt, konnte bei Versuchen mit Muskelbrei nichts anderes erwartet werden. Dies zeigen frühere Versuche mit Sauerstoff (8.), bei denen immer ein Ansatz direkt auf Gesamtkohlehydrate untersucht, der andere in einem

großen Reagenzglas mit Sauerstoff geschüttelt und dann erst die Kohlehydrate bestimmt wurden. Es ergab sich, daß der Kohlehydratwert bei Gegenwart von Sauerstoff praktisch konstant bleibt oder eine geringfügige Ab- bzw. Zunahme erfährt.

Bei entsprechenden Versuchen mit Muskelbrei und Methylenblau (13.) konnte keine Kohlehydratbildung nachgewiesen werden. In diesen Ansätzen ist nicht der Kohlehydratgehalt, sondern der Milchsäurewert bestimmt worden. Bei dem Ansatz mit Methylenblau ist die Milchsäurebildung sehr stark gehemmt im Vergleich zu dem Versuch ohne Methylenblau. Übertragen auf den Kohlehydratumsatz läßt sich analog sagen, daß bei Methylenblauversuchen weniger Kohlehydrate in Milchsäure übergeführt werden als in Vakuumversuchen ohne Methylenblauzusatz. Da bei dieser Versuchsanordnung immer eine starke Milchsäurebildung stattfindet, die zu einer Abnahme der Kohlehydrate führt, ist eine Konstanz des Kohlehydratwertes nicht möglich.

Die bisherigen Versuche sprachen für eine Kohlehydratbildung bei intakten und längsgeschnittenen Muskeln in laktathaltiger Lösung bei Gegenwart von Methylenblau. Es stand aber noch die Möglichkeit offen, ob nicht die Gegenwart von Laktat in den Vergleichsversuchen einen geringeren Kohlehydratschwund bewirkt oder ob überhaupt ein verminderter Kohlehydratabbau stattfindet. Um diese Annahmen auszuschließen, sind Kontrollversuche ohne Methylenblau im Vakuum angestellt worden. Es fand sich bei diesen Versuchen keine Kohlehydratbildung bzw. kein verminderter Kohlehydratabbau, sondern die auftretenden Unterschiede fallen innerhalb der Fehlergrenze der Methode Der Mittelwert bei Verwendung von intakten Muskeln betrug — 0,25 und bei längsgeschnittenen Muskeln — 0,45 mg Kohlehydrat.

Zusammenfassend kommt man zu dem Schluß, daß bei intakten und längsgeschnittenen Muskeln in laktathaltiger Lösung im Vakuum bei Gegenwart von Methylenblau eine Kohlehydratbildung stattfindet, während nach einmaliger Querzerschneidung des Muskels und bei Muskelbrei die Bildung von Kohlehydraten aufgehoben ist. Diese Versuchsresultate stehen in Übereinstimmung mit denen früherer Versuche in Sauerstoff, wo in gleichem Sinne die Abhängigkeit der Kohlehydratbildung von der Struktur des Muskels beobachtet wurde (8. 9.).

2. Versuche mit Bestimmung des Glykogengehaltes.

Bei der vorherigen Versuchsreihe ist zu berücksichtigen, daß bei Bestimmung der Gesamtkohlehydrate Stoffe mitbestimmt werden, die lediglich reduzierend wirken aber keine Kohlehydrate sind. Derartige Stoffe könnten bei Gegenwart von Methylenblau entstehen und als Kohlehydratzunahme gedeutet werden. Um diese Annahme auszuschließen ist in der folgenden Versuchsreihe der Glykogengehalt bestimmt worden, damit eine Bildung von Kohlehydraten in laktathaltiger Lösung einwandfrei nachgewiesen werden kann.

Die Durchführung der Versuche und die Zusammensetzung war die gleiche wie in der vorhergehenden Versuchsreihe. Zur Bestimmung des Glykogengehaltes wurden die Ansätze durch Zugabe von 20 ccm 60 % Lauge unterbrochen und 2 Stunden im Wasserbad gekocht. Danach wird das Ganze mit 40 ccm Spülwasser in eine Petrischale übergeführt, das Glykogen mit 160 ccm 96 % Alkohol gefällt und weiter behandelt wie bereits angegeben.

Die erhaltenen Resultate zeigen auch hier, daß bei intakten und längsgeschnittenen Muskeln im Vakuum bei Gegenwart von Methylenblau eine Glykogenvermehrung eintritt, während dies bei Verwendung von querzerschnittenen Muskeln nicht der Fall ist. Das Ergebnis stimmt mit der vorhergehenden Versuchsreihe, bei der die Gesamtkohlehydrate bestimmt wurden überein.

Das Mittel der beobachteten Glykogenzunahme ist auch in der gleichen Größenordnung. Es beträgt bei Verwendung von intakten Muskeln + 2,92, bei längsgeschnittenen Muskeln + 2,25 und bei querzerschnittenen Muskeln + 0,01 mg Glykogen.

Zum Vergleich wurden auch Versuche mit Sauerstoff ausgeführt, bei denen sich ein Mittelwert von + 3,74 mg ergab, der wesentlich größer ist als bei den früheren Sauerstoffversuchen mit Bestimmung der Gesamtkohlehydrate.

Zur weiteren Klarstellung der Frage sind noch Versuche durchgeführt worden, bei denen kein Sauerstoff und kein Methylenblau zugesetzt wurden. Hier trat keine vermehrte Glykogenbildung auf, wie zu erwarten war.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die Abhandlung beschäftigt sich mit der Kohlehydratbildung im Muskel bei Gegenwart von Methylenblau. Bisher ist eine Kohlehydratvermehrung in laktathaltiger Lösung und während der Erholung des Muskels nur bei Gegenwart von Sauerstoff nachgewiesen worden.

Auf Grund der vorstehenden Versuche ergibt sich, daß auch bei Ersatz des Sauerstoffs durch Methylenblau eine Kohlehydratbildung in laktathaltiger Lösung stattfindet. Diese Kohlehydratbildung ist von der Struktur des Muskels abhängig und geht nur im intakten und längsgeschnittenen Muskel vor sich. Im einmal querzerschnittenen Muskel und im Muskelbrei findet keine Bildung von Kohlehydraten mehr statt. Damit läßt sich die Kohlehydratbildung im Muskel nicht auf einfache physikalisch-chemische Reaktionen zurückführen. Wahrscheinlich spielen bei der Kohlehydratbildung im Muskel korrelative Dehydrierungsvorgänge eine Rolle.

Die Frage, wie weit noch andere oxydative Erholungsvorgänge bei Ersatz des Sauerstoffs durch andere Wasserstoffakzeptoren vor sich gehen, läßt sich noch nicht entscheiden. Nach den bisherigen Untersuchungen sind aber Anhaltspunkte dafür vorhanden, daß den Dehydrierungsvorgängen auch bei anderen Umsetzungen während der Erholung des Muskels eine Bedeutung zukommt.

Literaturverzeichnis.

1. Bertrand, Bull. soc. de Chim. Paris (3) 35. 1285 (1906).
2. Fischbach E., Inaugural-Dissertation München 1929.
3. Fischer G., Ber. 60. 2257 (1927).
4. Hahn A., Einführung in die physiol. chem. Arbeitsmethoden. Stuttgart 1936.
5. — Z. Biol. 91. 444 (1931).
6. — Z. Biol. 92. 355 (1932).
7. — u. Belmonte u. Niemer, Z. Biol. 91. 491 (1931).
8. — u. Fischbach u. Niemer, Z. Biol. 91. 53 (1930).
9. — u. Fischbach u. Niemer, Z. Biol. 91. 535 (1932).
10. — u. Haarman, Z. Biol. 86. 523 (1927).
11. — u. Niemer, 97. 135 (1936).
12. Kahn, Pflügers Archiv 196. 400 (1932).
13. Lorenz, Inaugural-Dissertation München 1934.
14. Lesser, Biochem. Z. 103. I. (1920).
15. Oster, J. of. biol. Chem. 85. 97 (1929/30).
16. Pflüger, Pflügers Archiv 96. 94 (1903).
17. Quastel and Wetham, Bioch. Journ. 18. 519 (1924).
18. Wieland, Ergebnisse d. Physiologie 20. 475 (1922).
19. Winterstein, Pflügers Arch. 198. 504 (1923).

Herrn Prof. Dr. Hahn danke ich verbindlichst für die freundliche Überlassung der Arbeit und die Übernahme des Referats. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Broemser für das meinen Studien jederzeit entgegengebrachte Interesse und Wohlwollen ergebenst danken.

Lebenslauf.

Am 7. November 1903 wurde ich, Dr. phil. Erich Fischbach, in Konstanz geboren und besuchte daselbst die Zeppelin-Oberrealschule, die ich nach bestandener Reifeprüfung im Frühjahr 1923 verließ. Ich widmete mich zunächst dem Studium der Chemie und studierte in Berlin, Freiburg, Bonn und München. Am chemischen Institut der Universität München legte ich bei Herrn Prof. Wieland den 1. und 2. Teil des chemischen Verbandsexamens ab. Im Jahre 1927 trat ich in die chemische Abteilung des Physiologischen Institutes ein, um meine chemische Doktordissertation auszuarbeiten; seither widmete ich mich auch dem medizinischen Studium. Im Juni 1929 bestand ich nach Einreichung einer Arbeit „Über den Abbau der Milchsäure im Muskel" das Doktorexamen in der philosophischen Fakultät der Universität München. Im Frühjahr 1936 legte ich das medizinische Staatsexamen ab und bin seit 1. Juli 1936 in der medizinischen Poliklinik tätig.